研究専用試薬

ラボバンカー 簡易使用説明書

血清タイプ凍結保存液

ラボバンカー１　BLB-1, BLB-1S

無血清タイプ凍結保存液

ラボバンカー２　BLB-2, BLB-2S

1 製品概要

培養細胞の凍結保存は、細胞株の保存のため必要不可欠の操作です。現在、細胞を懸濁してそのままディープフリーザーで凍結できる凍結保存液が一般的に使用されるようになりましたが、細胞によっては解凍後に増殖せずに徐々に死んでしまうことがありました。「ラボバンカー」では現在行われている幅広い研究に対応できるように成分の配合を検討し、DMSO の濃度を 10% で維持しつつも凍結保護性能を高めに設定したしました。それにより凍結に弱い細胞でも安心してディープフリーザーで凍結保存できるようになりました。

2 製品貯蔵方法

本保存液は、通常 4℃以下で保管して下さい。長期間保管する場合は凍結して保管して下さい。凍結と融解を繰り返すと性能が低下する恐れがありますので、一度融解したものは使用量に合わせて分割し凍結保存するか、4℃で保管することをお薦めいたします。

3 培養細胞の凍結・解凍方法

凍結プロトコール（接着細胞は（１）から、浮遊細胞（４）からはじめてください。）

(1) 培養シャーレ内の培地を取り除き、PBS で洗う。

(2) PBS を取り除いた後、Trypsin・EDTA－PBS を入れて室温で 5 分くらい放置する。[注 1)]

(3) 新しい培地を加えて pipetting をして細胞をシャーレから剥がす。

(4) 浮遊した細胞を遠心チューブに移し、細胞数を数える。

(5) 遠心分離し（200 ～ 300 g、5 分）、上清を捨てる。

(6) ラボバンカーを加え細胞を浮遊させる（5×10^5 ～ 5×10^6 cells /ml の割合で液量を決める）。[注 2)]

(7) クライオチューブに (6) の細胞浮遊液を 0.5ml ～ 1.0ml ずつ分注する。

(8) 氷上に 10 分間静置する。

(9) －80℃(ディープフリーザー）で凍結させる。[注 3, 4)]

(10) 長期保存の場合、24 時間後に－196℃(液体窒素）内で保存する。

注 1）接着細胞をシャーレから剥がす際に細胞に傷がつきますと、細胞が凍結に耐えられないため解凍後に生存率が低下します。

注 2）細胞の濃度は、おおよその目安としてください。適切な細胞の濃度は、解凍後に播種する細胞数（表 1）を考慮して、決めてください。濃度が範囲内に収まらない場合でも解凍後の生存率はほとんど変わりません。

注 3）クライオチューブを箱などに入れて凍結する場合は、冷気が直接クライオチューブに触れるように、一晩、箱などのふたを閉めないほうが解凍後の生存率が上昇します。

注 4）2 年ぐらいの凍結保存であればディープフリーザー内でそのまま保存できます 。ただしディープフリーザー の開け閉めが激しい場合は生存率が落ちることがあります。

表１　シャーレと細胞の濃度

	培地量	細胞数
6well プレート	2 ml	2×10^5 ～ 1×10^6 cells
10cm シャーレ	10 ml	1×10^6 ～ 5×10^6 cells
15cm シャーレ	20 ml	2×10^6 ～ 1×10^7 cells

解凍プロトコール

(1) 細胞を解凍する機器（ウォーターバス等）を細胞の培養温度にセットし、遠心機は室温にセットする。

(2) 凍結していた細胞懸濁液の 10 倍量の培地を遠心チューブに小分けして、培養温度に設定したウォーターバス等で温める。また (6) で細胞を播種するために使用する培地も温める。注 5)

(3) 凍結していた細胞をウォーターバス等で迅速に温めて、すべてが融解する瞬間まで温める。注 6, 7)

(4) 解凍した細胞を (2) で温めておいた培地に移して軽く転倒混和して、1 ～ 2 分間室温で静置する。

(5) 室温で 1 回遠心をして上清を除く。

(6) (2) で温めておいた培地を使って細胞をやさしく懸濁し、シャーレに移す。

(7) シャーレを CO_2 インキュベータ等に移して、常法どおり培養する。

注 5) DMSO に感受性が高い細胞（HL60 細胞など）でも、洗浄に使用する培地はあらかじめ温めてご使用ください。冷えた培地で洗浄した場合と比べて、播種後の生存率が上昇します。

注 6) -80℃の冷凍庫で凍結していた細胞を解凍する場合に、解凍に要する時間は概ね表２のようになります。細胞が解凍された後も温め続けますと、播種後の生存率が徐々に悪くなります。

注 7) 1 ～ 2 本のクライオチューブを解凍する場合であれば、次の操作まで氷冷は必要ありません。ただし多くの細胞を解凍して次の操作まで時間がかかる場合は、解凍後に氷冷して (4) で混和後に 2 分間室温で静置してください。

表２　解凍温度と解凍に要する時間

解凍温度 (= 培養温度)	凍結細胞 の体積	解凍時間 クライオチューブ底面 V 底	解凍時間 クライオチューブ底面 U 底
27℃ （昆虫細胞）	0.5 ml 1.0 ml	2 分 00 秒 ～ 2 分 20 秒 2 分 15 秒 ～ 2 分 30 秒	
37℃ （哺乳類細胞、大腸菌）	0.5 ml 1.0 ml	1 分 40 秒 ～ 2 分 00 秒 1 分 55 秒 ～ 2 分 10 秒	

4 保証

製造日より 3 年

5 免責事項

（１）使用期限を経過した製品の使用、または本取扱説明書に記載の取扱い方法以外の方法での製品の使用に起因するいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。

（２）洪水、豪雪、豪雨、地すべり、地震、津波、突風、竜巻等の天災地変、火災、停電、労働紛争、原材料の入手手段の停止その他の不可抗力によって生じた製品に関連するいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。

（３）製品に関連して生じた逸失利益を含む結果的損害、派生的損害、間接損害、特別損害および第三者からの請求に基づくいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。

（４）購入された製品に関して弊社が責任を負う場合においても、弊社の責任はその製品の販売金額を超えないものとします。

―納期・注文・製品の内容に関するお問い合わせ―

総発売元

十慈フィールド株式会社

〒103-0001
東京都中央区日本橋小伝馬町 14-10
アソルティ小伝馬町 Liens ビル 4 階
TEL：03-6264-9961
FAX：03-6264-9962

製造元

倉敷紡績株式会社
バイオメディカル部